



特許協力条約に基づいて公開された国際出願

| | | |
|--|-----------|--|
| <p>(51) 国際特許分類6 A61K 38/00, 38/58, C07K 14/47, 14/745, 14/81, 1/14, 1/36</p> | <p>A1</p> | <p>(11) 国際公開番号 WO99/22753</p> <p>(43) 国際公開日 1999年5月14日(14.05.99)</p> |
| <p>(21) 国際出願番号 PCT/JP98/04939</p> <p>(22) 国際出願日 1998年10月30日(30.10.98)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平9/320349 1997年11月5日(05.11.97) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 吉富製薬株式会社 (YOSHITOMI PHARMACEUTICAL INDUSTRIES, LTD.)[JP/JP] 〒541-0046 大阪府大阪市中央区平野町二丁目6番9号 Osaka, (JP)</p> <p>(72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてののみ) 後藤 節(GOTO, Takashi)[JP/JP] 浅原尚美(ASAHARA, Naomi)[JP/JP] 大水章正(OMIZU, Akimasa)[JP/JP] 〒573-1153 大阪府枚方市招提大谷2丁目25番1号 吉富製薬株式会社 血漿蛋白研究所内 Osaka, (JP) 上村八尋(UEMURA, Yahiro)[JP/JP] 〒651-2241 兵庫県神戸市西区室谷1丁目1番2号 国際試薬株式会社 研究開発センター内 Hyogo, (JP)</p> | | <p>(74) 代理人 弁理士 高島 一(TAKASHIMA, Hajime) 〒541-0046 大阪府大阪市中央区平野町三丁目3番9号 (湯木ビル) Osaka, (JP)</p> <p>(81) 指定国 AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), ユーロパ特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書 請求の範囲の補正の期限前の公開 ; 補正書受領の際には再公開される。</p> |
| <p>(54)Title: HEPARIN COFACTOR II PREPARATIONS AND PROCESS FOR PRODUCING THE SAME</p> <p>(54)発明の名称 ヘパリンコファクターII製剤及びその製造方法</p> <p>(57) Abstract Heparin cofactor II (HCII)-containing preparations substantially free from at least one contaminant selected from among degrading factors, degraded HCII, polymerized HCII and coloring matters, in particular, HCII-containing preparations substantially free from degrading factors and degraded HCII; one of the preparations as stated above substantially free from any infective virus; and a process for producing these preparations which involves the step of effecting an operation selected from among hydrophobic chromatography, fractionation by using a water-soluble polymer, salting-out and affinity chromatography with the use of a basic amino acid as a ligand, preferably together with the step of filtration with the use of a porous hollow yarn.</p> | | |

低分子化因子、低分子化ヘパリンコファクターII (HCII)、ポリマー化HCII
 および着色物質のうちの少なくとも1つの夾雑物質を実質的に含まないHCII
 含有製剤、特に低分子化因子および低分子化HCII を実質的に含まないHCII
 含有製剤である。さらに、感染力のあるウイルスを実質的に含まない上記いずれ
 かの製剤である。また、上記いずれかの製剤の製造方法である。

PCTに基づいて公開される国際出願のパフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

| | | | | | | | |
|----|--------------|----|---------|----|-----------------------|----|------------|
| AE | アラブ首長国連邦 | ES | スペイン | LI | リヒテンシュタイン | SG | シンガポール |
| AL | アルバニア | FI | フィンランド | LK | スリ・ランカ | SI | スロヴェニア |
| AM | アルメニア | FR | フランス | LR | リベリア | SK | スロヴァキア |
| AT | オーストリア | GA | ガボン | LS | レソト | SL | シエラ・レオネ |
| AU | オーストラリア | GB | 英国 | LT | リトアニア | SN | セネガル |
| AZ | アゼルバイジャン | GD | グレナダ | LU | ルクセンブルグ | SZ | スワジランド |
| BA | ボスニア・ヘルツェゴビナ | GE | グルジア | LV | ラトヴィア | TD | チャード |
| BB | バルバドス | GH | ガーナ | MC | モナコ | TG | トーゴ |
| BE | ベルギー | GM | ガンビア | MD | モルドヴァ | TJ | タジキスタン |
| BF | ブルキナ・ファソ | GN | ギニア | MG | マダガスカル | TM | トルクメニスタン |
| BG | ブルガリア | GW | ギニア・ビサウ | MK | マケドニア旧ユーゴスラヴィア 共和国 | TR | トルコ |
| BJ | ベナン | GR | ギリシャ | ML | マリ | TT | トリニダード・トバゴ |
| BR | ブラジル | HR | クロアチア | MN | モンゴル | UA | ウクライナ |
| BY | ベラルーシ | HU | ハンガリー | MR | モーリタニア | UG | ウガンダ |
| CA | カナダ | ID | インドネシア | MW | マラウイ | US | 米国 |
| CF | 中央アフリカ | IE | アイルランド | MX | メキシコ | UZ | ウズベキスタン |
| CG | コンゴ | IL | イスラエル | NE | ニジェール | VN | ヴェトナム |
| CH | スイス | IN | インド | NL | オランダ | YU | ユーゴスラビア |
| CI | コートジボアール | IS | アイスランド | NO | ノールウェー | ZA | 南アフリカ共和国 |
| CM | カメルーン | IT | イタリア | NZ | ニュージーランド | ZW | ジンバブエ |
| CN | 中国 | JP | 日本 | PL | ポーランド | | |
| CU | キューバ | KE | ケニア | PT | ポルトガル | | |
| CY | キプロス | KG | キルギスタン | RO | ルーマニア | | |
| CZ | チェコ | KP | 北朝鮮 | RU | ロシア | | |
| DE | ドイツ | KR | 韓国 | SD | スーダン | | |
| DK | デンマーク | KZ | カザフスタン | SE | スウェーデン | | |
| EE | エストニア | LC | セントルシア | | | | |

明 細 書

ヘパリンコファクター II 製剤及びその製造方法

5 技術分野

本発明は、高純度のヘパリンコファクターII（以下、「HCII」という）を含有する製剤及びその製造方法に関する。より詳細には、本発明は、低分子化因子、特にプロテアーゼを実質的に含有しない、ひいては、低分子化HCII分子を実質的に含有しない高純度HCII含有製剤およびその製造方法に関する。

10

背景技術

HCIIは、SDSポリアクリルアミド電気泳動（SDS-PAGE）により求めた分子量が約72kDaの一本鎖の血漿糖蛋白質であり、そのcDNAの塩基配列も既に同定されている（*J. Biol. Chem.*, 257, 2162-2169, 1982; *Nucleic Acids Res.*, 14, 1073-1088, 1986）。HCIIの生理作用は十分解明されていないが、トロンビンを特異的に阻害する抗凝固物質の1つである。血中で抗トロンビン作用を有する他の蛋白質としては、主にアンチトロンビンIII（以下「ATIII」という。）が知られているが、HCIIはATIIIとは作用部位が異なり、血管内皮細胞上よりも血管内皮細胞下の血管中膜におけるトロンビン阻害物質として機能していると考えられ（*Thromb. Res.*, 62, 409-419, 1991）、血流異常を生じる各種疾患をはじめ、敗血症や各種臓器障害、各種炎症などの疾患の予防および治療への適用可能性が示唆されている（特開平9-176040号公報）。

20

25

HCIIは全血漿、血漿分画、あるいは組換え宿主細胞培養物等から精製されるが、その際除去されるべき夾雑物質として、HCII以外の血漿由来成分や宿主由来成分の他、ポリマー化および断片化（低分子化）したHCIIが挙げられる。ポリマー化したHCIIは活性がなく、また、一般に蛋白質のポリマーはその投与に

よりショックや血圧降下などの好ましくない副作用を生じることが知られている。
低分子化したHCIIについては、ヒト血漿を原料として精製した場合に混入して
くることが報告されている (*J. Biol. Chem.*, 260, 2218-2225, 1985)。また、N
末側から67残基が欠失したHCIIは、ヘパリンもしくはデルマタン硫酸存在下
でのトロンビン阻害速度が大幅に低下することが知られている (*Thoromb.*
Haemost., 74, 1209-1214, 1995)。すなわち、低分子化HCIIには活性が低いも
のがある。さらに低分子化した蛋白質の一般的性質を鑑みれば、低分子化HCII
は抗原性を示す可能性や、半減期が短いために効果が長期間持続しない可能性が
ある。

上記報告および本発明者らの予備的知見にもとづけば、HCIIを低分子化させ
る要因（すなわち、低分子化因子）として特に重要なものは、血漿あるいは宿主
細胞由来のプロテアーゼである。例えば、ヒト血漿のコーンのエタノール分画法
による分画I上清や分画II+III上清等を出発原料としてHCIIを精製する場合、
72kDa分子の他に66kDaや60kDaの低分子化されたHCII断片が
混在する。これらはいずれもHCII分子内のリジン残基のカルボキシル側のペプ
チド結合が切断されたものであることから、血漿中の特異的エンドペプチダーゼ
の作用により生成したものと推定される。

たとえ、低分子化されたHCIIを完全分子型HCIIから分離除去したとしても、
プロテアーゼが最終製剤中に夾雑していれば、保存中にさらにHCIIの低分子化
が引き起こされる。プロテアーゼインヒビター添加による不活化という手段もあ
り得るが、臨床への使用を考慮すればプロテアーゼはできる限り除去することが
望ましい。また、組換え宿主細胞由来のプロテアーゼは抗原性の面からも最終製
剤中から除去される必要がある。しかしながら、従来のHCIIの精製方法ではH
CIIとプロテアーゼとを完全には分離できないのが現状である。

したがって、本発明の目的は、プロテアーゼなどの低分子化因子を実質的に含
まないHCII含有製剤およびその製造方法を提供することであり、また、低分子

化したHCII を実質的に含まないHCII 含有製剤およびその製造方法を提供することである。また、本発明の別の目的は、ポリマー化したHCII または着色物質を実質的に含まないHCII 含有製剤を提供することである。さらに、本発明の目的は、98%以上の純度、好ましくは99%を越える純度にまで精製されたHCII を含有するHCII 含有製剤およびその製造方法を提供することである。また、
5 本発明の別の目的は、感染力のあるウイルスを実質的に含まない上記のいずれかのHCII 含有製剤およびその製造方法を提供することである。

発明の開示

10 本発明は、HCII および、プロテアーゼなどの低分子化因子を含有する溶液を、疎水性クロマトグラフィー、水溶性ポリマー処理、塩析および塩基性アミノ酸をリガンドとしたアフィニティークロマトグラフィーのうちの1つまたは2つ以上の処理に付すことにより、HCII と低分子化因子を効率よく分離し得るのを見出したことに基づいている。さらに、上記工程の前または後に、固定化ヘパリンを用いたアフィニティークロマトグラフィーおよび陰イオン交換クロマトグラフィー
15 ーを行い、さらにその後限外濾過および／またはゲル濾過クロマトグラフィー等の処理に付すことにより、低分子化因子、ポリマー化または低分子化したHCII および着色物質を実質的に含まず、且つHCII の純度が98%以上の、好ましくは99%を越えるHCII 含有溶液が得られる。このHCII 含有溶液をウイルス除去または不活化処理に付すことにより、製剤中のHCII に不利な影響を与えるこ
20 となく、感染力のあるウイルスを実質的に含まないHCII 含有製剤が製造される。

すなわち、本発明は、低分子化因子、低分子化HCII、ポリマー化HCII および着色物質のうちの少なくとも1つを実質的に含有しないHCII 含有製剤、好ましくは低分子化因子および低分子化HCII を実質的に含有しないHCII 含有製剤、より好ましくは、さらにポリマー化HCII および／または着色物質を実質的
25 に含有しないHCII 含有製剤を提供する。また、本発明は、製剤中に含有される

H C I I の純度が 9 8 % 以上の、好ましくは 9 9 % を越える H C I I 含有製剤を提供する。さらに、本発明は感染力のあるウイルスを実質的に含有しない上記のいずれかの H C I I 含有製剤を提供する。

また、別の本発明は、H C I I および低分子化因子を含有する溶液から H C I I と低分子化因子を分離する工程、特に、疎水性クロマトグラフィー処理、水溶性ポリマーによる分画処理、塩析および塩基性アミノ酸をリガンドとするアフィニティークロマトグラフィー処理のうちの 1 つまたは 2 つ以上の処理からなる工程を含む H C I I 含有製剤の製造方法である。本発明は、さらに低分子化 H C I I を除去する工程、特にゲル濾過処理からなる工程を含む当該製造方法である。また、本発明は、さらに濾過処理、加熱処理または界面活性剤処理のうちの少なくとも 1 つのウイルス除去または不活化処理の工程、好ましくは、多孔性中空糸による濾過処理の工程を含む上記の H C I I 含有製剤の製造方法である。

図面の簡単な説明

第 1 図は、固相化ヘパリン処理および陰イオン交換クロマトグラフィー処理により得られた H C I I 含有画分の、ゲル濾過クロマトグラフィーのプロファイルを示す図である。

第 2 図は、ゲル濾過クロマトグラフィーにより得られる有効 H C I I 精製画分の S D S - ポリアクリルアミドゲル電気泳動像である（レーン 1 および 3 : 分子量マーカー、レーン 2 : 非還元 H C I I , レーン 4 : 還元 H C I I) 。

第 3 図は、ゲル濾過クロマトグラフィーにより得られる有効 H C I I 精製画分の高速液体クロマトグラフィー分析の結果を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

本発明の H C I I 含有製剤中の H C I I は、S D S - P A G E により分子量約 7 2 k D a の位置に肉眼上単一のバンドを示し、且つ高速液体クロマトグラフィーに

より単一のピークを与え、等電点が約 5 であり、トロンビン、キモトリプシンおよびカテプシン G 阻害作用を有するタンパク質をいう。したがって、本発明の HCII（以下、ポリマー化または低分子化した HCII と区別する意味で、特に「有効 HCII」という場合もある）は、上記の性質を満たす限り必ずしも完全長のアミノ酸配列を有する分子（完全分子型）に限定されない。

本発明の HCII 含有製剤の原料となる HCII 含有溶液は、上記の性質により特定される HCII を適当な量含有するものであればその由来に特に限定はなく、天然の血漿由来のものも、また、HCII を産生するように遺伝子操作された組換え宿主細胞由来のものもすべて包含される。血漿由来のものとしては、例えば全血漿、HCII 活性の高い血漿分画、好ましくはコーンのエタノール分画の上清 I、上清 II+III または画分 IV などが挙げられる。また、血漿の生物起源も特に制限はなく、例えばヒトやウシ由来のものなどが挙げられるが、好ましくはヒト由来のものである。

組換え宿主細胞由来の HCII 含有溶液としては、上記の天然血漿中に含まれる HCII をコードする遺伝子で形質転換された宿主細胞を培養して得られる培養物の HCII 含有画分、例えば培養液、細胞抽出液、培養上清などが挙げられる。宿主細胞は特に制限はないが、大腸菌、枯草菌、乳酸菌などの細菌、酵母などの真菌類、動植物細胞、昆虫細胞などが好ましく例示される。また、HCII をコードする遺伝子を組み込んだトランスジェニック動物などの体液も挙げられる。

本発明において、低分子化因子とは、HCII の断片化を引き起こす化学的および酵素学的要因をいい、高温、低温、物理的な剪断力などの物理的要因は含まない。具体的には、例えばプロテアーゼ、糖鎖もしくはシアル酸分解酵素、強酸、強アルカリなどが挙げられるが、出発原料となる HCII 含有溶液の由来を考慮すれば、主要な低分子化因子はプロテアーゼである。

本発明の製造方法は、HCII および低分子化因子を含有する溶液から、HCII と低分子化因子とを分離する工程を含むことを特徴とする。該工程としては、好

ましくは、疎水性クロマトグラフィー処理、水溶性ポリマーによる分画処理、塩析または塩基性アミノ酸をリガンドとするアフィニティークロマトグラフィーが例示される。これらの処理は単独で用いても、あるいは組み合わせて実施してもよい。

5 疎水性クロマトグラフィー処理は、例えば、pH 6～9の条件下で、HCII および低分子化因子を含有する溶液を疎水性クロマト用担体に接触させることにより行われる。疎水性クロマト用担体としては、炭素数4～18のアルキル基型（例えば、ブチル基型、オクチル基型、オクチルデシル基型等）、フェニル基型などが例示される。ブチル基型としては、ブチルーアガロース、ブチルポリビニル（商
10 品名：ブチルトヨパール、東ソー社製）などが、オクチル基型としては、オクチルーアガロースなどが、オクチルデシル基型としては、オクチルデシルルーアガロースなどが、フェニル基型としては、フェニルーセルロース（商品名：フェニルセロファイン、生化学工業社製）などが例示される。該処理によりHCIIは未吸着画分に回収され、低分子化因子は担体に吸着する。

15 水溶性ポリマーによる分画処理は、水溶性ポリマーを1～30%（w/v）、好ましくは3～20%（w/v）、より好ましくは6～12%（w/v）の濃度となるようにして、HCII および低分子化因子を含有する溶液に添加することにより行われる。該処理によりHCIIは溶液中に残り、低分子化因子は沈殿する。処理液を遠心分離または濾過して上清（濾液）を回収することにより、HCIIから低
20 分子化因子を分離することができる。ここで、水溶性ポリマーとは、ポリエチレングリコール（PEG）や非イオン性界面活性剤等をいう。PEGは平均分子量4000～6000のものが好ましい。また、界面活性剤としては、ポリオキシエチレン（160）ポリオキシプロピレン（30）グリコール、ポリオキシエチレン（20）ソルビタンモノオレート等が挙げられる。

25 塩析処理は、HCII および低分子化因子を含有する溶液に、ナトリウム、カリウム、バリウム、アンモニウム等の塩、例えば塩化物、硫酸塩、リン酸塩等を0.

0.5～0.25Mの濃度となるように添加することにより行われる。好ましくは、塩化バリウムを0.05～0.2Mとなるように添加する方法が例示される。該処理によりHCIIは溶液中に残り、低分子化因子は沈殿する。処理液を遠心分離または濾過して上清（濾液）を回収することにより、HCIIから低分子化因子を分離することができる。

塩基性アミノ酸をリガンドとするアフィニティークロマトグラフィーは、pH 6～9の条件下で、HCIIおよび低分子化因子を含有する溶液を、リジン、アルギニンなどの塩基性アミノ酸、好ましくはリジンをリガンドとして固相化したクロマト用担体に接触させることにより行われる。該担体としては、例えば多糖類、シリカゲル、繊維よりなる不溶性の支持体が挙げられる。より詳細には、寒天、アガロース、架橋アガロース、セルロース、シリカ、ナイロン、親水性のビニルポリマー等である。該処理によりHCIIは未吸着画分に回収され、低分子化因子は担体に吸着する。

低分子化HCIIの生成を最小限にし、その後の精製を容易にするとともにHCIIの回収率を高めるためには、HCIIと低分子化因子とを分離する工程は、精製の早い段階で実施することがより好ましい。

本発明の好ましい態様においては、HCIIおよび低分子化因子を含有する溶液は、まず固相化ヘパリンに接触させてHCIIをヘパリンに結合させるのが好ましい。固相化ヘパリンは、例えば多糖類、シリカゲル、繊維よりなる不溶性の支持体などの固相に結合された単量体ヘパリンである。支持体の例としては、寒天、アガロース、架橋アガロース、セルロース、シリカ、ナイロン、親水性のビニルポリマー、その他当該分野で公知のものが挙げられる。かかる固相化ヘパリン処理は、HCIIと低分子化因子とを分離する工程の前に限らず、後に行っても差し支えない。該処理によりポリマー化したHCIIおよび低分子化HCIIの一部は、モノマーHCII（有効HCII）画分とは別の画分に分離、除去される。本発明において、ポリマー化HCIIとは、HCIIの生理活性がなくヘパリンに対するア

イニテーターが低い、HCII 分子の重合体を意味する。より具体的には、二量体またはそれ以上の重合体である。

HCII は、塩濃度 0.05 ~ 0.2 M 程度の緩衝溶液などで洗浄した後に、好ましくは段階的に塩濃度を上げて洗浄操作を繰り返した後に、塩濃度 0.05 ~ 1.0 M 程度、好ましくは 0.1 ~ 0.5 M 程度、さらに好ましくは 0.1 ~ 0.2 M 程度の緩衝液に接触させるなどの方法により、固相化ヘパリンから溶出される。イオン強度を調製するための塩成分としては、塩化ナトリウム、塩化カリウム、硫酸アンモニウム、チオシアン酸ナトリウム、硫酸ナトリウム等が挙げられる。好ましくは塩化ナトリウムである。また、当該緩衝液の pH は、6 ~ 9 に設定する。

本発明のより好ましい態様においては、HCII 含有溶液はさらに陰イオン交換クロマトグラフィー処理に付される。用いられる陰イオン交換体としては、DEAE 系 [DEAE-セファデックス、DEAE-セルロース、DEAE-セファロース、DEAE-ポリビニル (例: DEAE-Toyopearl) など]、QAE 系 [QAE-セファデックス、QAE-セルロース、QAE-セファロース、QAE-ポリビニル (例: QAE-Toyopearl) など] が例示される。

陰イオン交換クロマトグラフィー処理における、陰イオン交換体の平衡化及び洗浄は、0.005 ~ 0.1 M のクエン酸緩衝液 (pH 6 ~ 8 程度)、0.005 ~ 0.1 M のリン酸緩衝液 (pH 6 ~ 8 程度) または 0.005 ~ 0.1 M のトリス塩酸緩衝液 (pH 7 ~ 9) などを用いることによって行われる。また、陰イオン交換体からの HCII の溶出は、平衡化及び洗浄に用いられる緩衝液であって、0.05 ~ 0.5 M、好ましくは 0.2 ~ 0.25 M の塩化ナトリウムを含有するものを用いる。

上記の HCII と低分子化因子を分離するための処理、固相化ヘパリン処理および陰イオン交換クロマトグラフィー処理の順序は特に限定されず、任意に選択することができる。また、精製工程における HCII のポリマー化および低分子化を

できるだけ防ぐ意味から、特に条件の指定のない限り、上記の各処理はpH6～9、4～20℃の条件下で行うことが望ましい。また、上記の各工程で使用されるすべての緩衝液は、ポリマー生成防止のために0.001%～1.0% (w/v) の水溶性ポリマー (例: PEG4000等) を含んでいることがより好ましい。

5 上記の各精製処理の結果得られるHCII 活性画分には、低分子化したHCII 分子が夾雑している可能性がある。本発明において、低分子化HCII とは、高速液体クロマトグラフィー (以下、HPLCという) により「有効HCII のピークと区別されるピーク (ショルダー) を与えるような断片化されたHCII 分子」を意味する (HPLCの条件は後で定義する)。したがって、低分子化したHCII
10 を分離除去するために、該HCII 活性画分をさらに限外濾過および/またはゲル濾過クロマトグラフィー等の分子量の差に基づく分離工程に付すことが好ましい。

限外濾過に用いられる限外濾過膜としては、有効HCII を通過させずに低分子化HCII のみを通過させる程度の孔径を有する膜であれば特に制限はないが、例
15 えばアセチルセルロース、アクリルニトリル共重合体、芳香族ナイロン、ポリサルホン、ポリフッ化ビニリデン、ポリイミド樹脂膜などが通常用いられ、管状膜、平膜、スパイラルモジュール、中空糸モジュールなどの種々の形態を選択して使用できる。限外濾過膜の孔径は一定していないので、除去されるべき低分子化HCII と有効HCII との分子量の差が小さい場合には、まず限外濾過により有効HCII
20 を濃縮した後、さらにゲル濾過クロマトグラフィーに付すことが好ましい。

ゲル濾過クロマトグラフィー処理に用いられるゲルとしては、架橋デキストラン
25 ビーズ (例: セファデックス)、架橋ポリアクリルアミドビーズ (例: バイオゲル)、アガロースゲル (例: セファロース)、デキストラン-アクリルアミド (例: セファクリル) などが挙げられる。ゲル濾過には、0～0.5M、好ましくは0.1～0.2Mの塩化ナトリウムを含有する0.01～0.05Mのクエン酸緩衝液またはリン酸緩衝液 (pH6～9程度) などが用いられる。

H C I I のポリマー化および低分子化をできるだけ防ぐために、上記の限外濾過およびゲル濾過クロマトグラフィー処理は、p H 6 ~ 9、4 ~ 2 0 ° C の条件下で行うことが望ましい。また、上記の各工程で使用されるすべての緩衝液は、ポリマー生成防止のために 0 . 0 0 1 % ~ 1 . 0 % (w / v) の水溶性ポリマー（例：PEG 4 0 0 0 等）を含んでいることがより好ましい。

上記の各処理による H C I I の精製の程度は、波長 2 8 0 n m での吸光度 (A_{280}) を測定して得られるタンパク量および H C I I の比活性を指標としてモニターされる。H C I I の活性は、後記実施例に詳述される方法によりトロンビン活性阻害作用を指標に測定することができる。

上記の各処理の結果得られる精製 H C I I 含有溶液は、自体公知の手法にて製剤化することにより高純度の H C I I 含有製剤とすることができる。この際、必要に応じて、医薬上許容される担体、添加剤などの添加および加熱、滅菌、除菌濾過、ウイルス不活化、ウイルス除去、分注小分け、凍結乾燥処理などが通常の方法に準じて行われる。

本発明の精製 H C I I 含有溶液は、感染力のあるウイルスを実質的に含まないようにさらにウイルス不活性化および／または除去処理の工程に付すことが好ましい。ここで「ウイルスを実質的に含まない」とは、ウイルス感染力力価 ($T C I D_{50}$) が検出限界以下となる程度にウイルスが不活性化されているか、あるいはウイルスゲノム量が 1 P C R 単位 (*Transfusion*, 32, 824-828, 1992 に記載される P C R 測定法にて検出される最小の核酸量) 以下である程度にウイルスが除去されていることを意味する。

ウイルス不活性化方法としては、従来公知のいかなる方法も用いることができる。例えば、液状加熱処理、乾燥加熱処理、界面活性剤による処理等が挙げられる。但し、H C I I の変性、低分子化、ポリマー化などの H C I I の生理活性に不利な影響ができる限り少ない方法を選択することが好ましい。H C I I は熱に不安定であるから、適当な安定剤（例えば酸性アミノ酸等）存在下での液状加熱処理、

乾燥加熱処理、界面活性剤による処理等がより好ましく例示される。

ウイルス除去方法としては、ウイルス除去膜、すなわち、HCII 分子は通過し得るがウイルス粒子は通過できない程度の孔径を有する膜を用いた濾過処理が好ましく例示される。該ウイルス除去膜は、管状膜、平膜、中空糸などの種々の形態で使用する事ができるが、好ましくは多孔性中空糸が例示される。

多孔性中空糸は管状の糸であつて、その周壁に中空糸内部の中空部から外部に貫通する孔を多数有し、この周壁が濾過に用いられる膜となる。本発明で用いられる多孔性中空糸の周壁の孔の平均孔径は $1\text{ nm} \sim 100\text{ nm}$ である。好ましくは $10\text{ nm} \sim 50\text{ nm}$ 、さらに好ましくは $15 \pm 2\text{ nm}$ である。この範囲とすることにより、夾雑ウイルスを HCII 含有溶液中から除去することができる。また、多孔性中空糸の中空部の内径は、好ましくは、 $330 \pm 30\text{ }\mu\text{m}$ である。また周壁の厚み（膜厚）は、好ましくは $27 \pm 3\text{ }\mu\text{m}$ である。

多孔性中空糸を形成する素材は特に制限されないが、再生セルロースが好ましく用いられる。再生セルロースからなる多孔性中空糸は、好ましくは、セルロース銅アンモニア溶液からマイクロ相分離法 (*Am. Chem. Soc.*, 9, 197-228, 1985) により調製される。

多孔性中空糸は、好ましくはモジュールの態様で使用される。例えば、多孔性中空糸を多数平行に束ねてカートリッジに充填し、接着剤を用いて一体化した態様が挙げられる。

濾過する際の HCII 含有溶液の温度は、 $4^{\circ}\text{C} \sim 50^{\circ}\text{C}$ であり、好ましくは $4^{\circ}\text{C} \sim 20^{\circ}\text{C}$ である。濾過圧力は $0.1\text{ kgf/cm}^2 \sim 1\text{ kgf/cm}^2$ であり、好ましくは、 $0.4\text{ kgf/cm}^2 \sim 0.9\text{ kgf/cm}^2$ である。好ましくは、HCII 濃度を $0.01 \sim 10\%$ (w/v)、より好ましくは $0.1 \sim 4\%$ (w/v) とすることにより、HCII 含有溶液を効率よく濾過することができる。

濾過処理の方法としては、溶液にひずみ速度を与えながら濾過するクロスフロー濾過法（循環式）と溶液にひずみ速度を与えずに濾過するデッドエンド濾過法

(非循環式)がある。いずれの方法においても加圧空気法によって行うことがより好ましい。

上記のウイルス不活性化処理とウイルス除去処理はそれぞれ単独で用いても感染力のあるウイルスを実質的に除去することができるが、両者を組み合わせて用いることがより好ましい。その順序は特に制限されないが、ウイルス不活性化処理の後にウイルス除去処理を行うことがより好ましい。

上記の各工程の結果得られるHCII含有製剤は、低分子化因子、低分子化HCII、ポリマー化HCIIおよび着色物質のうちの少なくとも1つを実質的に含有しないことを特徴とする。本発明において、着色物質とは、410nmに特異的な吸収を示す夾雑物質をいい、例えばハプトグロビン、トランスフェリンなどが挙げられる。また、ここで「低分子化因子を実質的に含まない」とは、0.1M リン酸ナトリウム緩衝液中、pH8、25℃の条件下で48~120時間インキュベートした後も、HPLC (G3000SW_{XL})により低分子化HCIIが検出されないことを意味する。「低分子化(またはポリマー化)HCIIを実質的に含まない」とは、HPLC (G3000SW_{XL})により低分子化(またはポリマー化)HCIIのピークが検出されないことを意味する(ここで、HPLCの条件は下記の通りである)。

カラム: G3000SW_{XL} (φ7.8mm×30cm; 東ソー社製)

溶離液: 0.1M 酢酸ナトリウム, 0.3M 塩化ナトリウム,

0.1% アジ化ナトリウム (pH6.5)

流速: 1.0mL/分

検出波長: 280nm

検体注入量: 50μL (A_{280} = 約1 (最小0.2~最大2の範囲内とする))

さらに「着色物質を実質的に含まない」とは、後記実施例において定義される着色度(C.I.)が50以下であることを意味する。好ましくは、本発明のHCII含有製剤は、低分子化因子および低分子化HCIIを実質的に含まず、より好まし

くは、該HCII含有製剤は、さらにポリマー化HCIIおよび着色物質のうちの一
方もしくは両方を実質的に含まない。

特に好ましい態様においては、本発明のHCII製剤は、総タンパク量に対する
HCII純度が98%以上、就中99.9%以上にまで精製された有効HCIIを含
有する。

本発明を以下の実施例により詳述するが、本発明はこれら実施例によって限定
されるものではない。なお、以下の実施例の各精製工程において使用されるすべ
ての緩衝液は、HCIIのポリマー化を防ぐために0.01もしくは0.1% (w
/v) の水溶性ポリマー (例: PEG4000等) を含んでいる。

比較例1 ヒト血漿分画からのHCIIの精製 (I)

(1) 固相化ヘパリン処理

コーンの分画の上清II+IIIをヘパリンゲルを用いたアフィニティークロマト
グラフィーに付し、さらに0.4M NaClを含む緩衝液で溶出して得られる
画分 (HCII純度約1%; 以下、粗精製品という) を、20mMリン酸緩衝液 (p
H8.0) で洗浄したヘパリンゲルのカラム ($\phi 5 \times 2.5$ cm) に4℃で通し
(70 [A₂₈₀] / mLゲル)、次いで吸着画分を0.1~0.15M NaClを
含む20mMリン酸緩衝液 (pH8.0) で溶出したところ、粗精製品より7.
5~9.6倍比活性が上昇したHCII含有画分が得られた。なお、HCIIの活性
は以下のようにして測定した。すなわち、検体希釈液に60mM EDTA、0.
2% HSAおよび0.1mg/mL デルマタン硫酸を含む40mM トリス
緩衝液 (pH8.56) 50 μ L、並びに0.05% ウシ血清アルブミンおよ
び0.05% PEG6000を含む1.0U/mL トロンビン溶液100 μ
Lを添加し、37℃にて5分間静置した後、0.95mg/mL H-D-フェ
ニルアラニル-L-ピペコリル-L-アルギニル-p-ニトロアニリド二塩酸塩

溶液 100 μ L を添加して 37°C、5 分間インキュベートした。2% クエン酸 1 mL を加えて反応を停止させた後、405 nm での吸光度 (A_{405}) を測定し、従来法により調製された部分精製品を標準品として [吸光係数: $E^{1\%} = 5.93$ (*Arch. Biochem. Biophys.*, 259, 331-340, 1997) と A_{280} から求めたタンパク濃度 0.1 mg/mL を 1 U とした] 作成した検量線より HCII 活性を算出した。

(2) 陰イオン交換クロマトグラフィー

(1) で得られた HCII 含有画分を、40 mM リン酸緩衝液 (pH 8.0) で平衡化した QAE-ポリビニルカラム ($\phi 5 \times 2.5$ cm) に 4°C で通し (12 [A_{280}] / mL ゲル)、次いで吸着画分を 0.15 ~ 0.40 M NaCl (0.05 M づつのステップワイズグラジエント) を含む 40 mM リン酸緩衝液 (pH 8.0) で溶出したところ、0.20 ~ 0.25 M NaCl を含む緩衝液で溶出させた画分に比活性 15.4 U / A_{280} の HCII 活性が 92% の収率で得られた。

粗精製品から計算すると、比活性が 67 ~ 91 倍上昇した HCII 含有画分が 71% の収率で回収されたことになる。この HCII 含有画分を 10 ~ 20% グラジエントゲル (第一化学製) を用いて SDS-PAGE (20 mA / ゲル, 約 1.5 時間) により解析した。ゲルの染色はクイック染色キット (和光純薬製) を使用して行った。その結果、有効 HCII に相当する 72 kDa の位置に主バンドが検出されたが、それ以外に N 末の 42 アミノ酸残基が欠失した低分子化 HCII に相当する 66 kDa のバンドと成分未同定の 35 kDa のバンドも検出された。該 HCII 含有画分を冷室に放置しておくとも HCII の低分子化がさらに進行し、最終的に 72 kDa の分子が検出できなくなる場合もあった。このことから、固相化へパリン処理および陰イオン交換クロマトグラフィー処理によって HCII の低分子化因子、特にプロテアーゼを除去できないことが明らかとなった。

(3) ゲル濾過クロマトグラフィー

(2) で得られた HCII 含有画分を 10 kDa カットの限外濾過膜によりタンパク濃度が 20 mg/mL となるよう濃縮し、ゲル濾過クロマトグラフィー用担

体である Superdex 200 pg ($\phi 1.6 \times 60$ cm; ファルマシア製) に、カラムの 1% 体積分 (1.2 mL) をアプライし、以下の条件で溶出させた。

緩衝液: 0.15 M NaCl 含有 20 mM リン酸緩衝液 (pH 8.0)

流速: 10 時間/カラム

5 温度: 4°C

その結果、HCII 活性のピークは 72 kDa 分子に相当する主画分 (有効 HCII 精製画分) とそれよりも低分子画分 (低分子化 HCII 含有画分) とに分かれた。

有効 HCII 精製画分の比活性は $16.8 \text{ U} / A_{280}$ であり、SDS-PAGE 分析の結果 72 kDa の位置に単一のバンドを与え、さらに HPLC (G3000S W_{XL}) によっても単一のピークが検出されたことから、該精製画分は低分子化およびポリマー化した HCII 分子を実質的に含まないことが示された。また、該精製画分の着色度 [$C. I. = A_{410} / A_{280} \times 1000$ と定義する] は 12.3 で、且つ実質的にハプトグロビン、トランスフェリンなどの着色物質を含まなかった。しかしながら、該有効 HCII 精製画分を冷室にまたは室温で放置しておく、上

10

15 記 (2) と同様の低分子化が進行した。このことから、低分子化因子 (プロテアーゼ) はゲル濾過によっても除去できないことがわかった。

比較例 2 ヒト血漿分画からの HCII の精製 (II)

(1) 固相化ヘパリン処理

緩衝液を 20 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 8.5)、アプライする HCII 粗精製品量を $30 [A_{280}] / \text{mL}$ ゲル、および溶出液を 0.1 M NaCl を含む 20 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 8.5) に変更する以外は比較例 1 の (1) と同様にして固相化ヘパリン処理を行った。その結果、粗精製品より 13.6 ~ 19.3 倍比活性が上昇した HCII 含有画分が得られた。

20

(2) 陰イオン交換クロマトグラフィー

吸着画分を 0.15 ~ 0.45 M NaCl (0.05 M ずつのステップワイズグラジエント) を含む 40 mM リン酸緩衝液 (pH 8.0) で溶出する以外は

25

比較例 1 の (2) と同様にして陰イオン交換クロマトグラフィーを行った。その結果、0.20~0.25M NaCl を含む緩衝液で溶出させた画分に比活性 17.4 U/A₂₈₀ の HCII 活性が 95% の収率で得られた。

粗精製品から計算すると、比活性が 76~102 倍上昇した HCII 含有画分が 66% の収率で回収されたことになる。この HCII 含有画分を比較例 1 の (2) と同様に SDS-PAGE により解析したところ、有効 HCII に相当する 72 kDa の位置に主バンドが検出されたが、それ以外にやはり N 末の 42 アミノ酸残基が欠失した低分子化 HCII に相当する 66 kDa のバンドと成分未同定の 35 kDa のバンドが検出された。該 HCII 含有画分も冷室に放置しておくとも HCII の低分子化がさらに進行し、最終的に 72 kDa の分子が検出できなくなる場合もあった。

(3) ゲル濾過クロマトグラフィー

(2) で得られた HCII 含有画分を 10 kDa カットの限外濾過膜によりタンパク濃度が 20 mg/mL となるよう濃縮し、ゲル濾過クロマトグラフィー用担体である Superdex 200 pg (φ 1.6 × 60 cm; ファルマシア製) に、カラムの 1% 体積分 (1.2 mL) をアプライし、以下の条件で溶出させた。

緩衝液: 0.15M NaCl 含有 20 mM リン酸緩衝液 (pH 8.0)

流速: 10 時間/カラム

温度: 4℃

その結果、HCII 活性のピークは 72 kDa 分子に相当する主画分 (有効 HCII 精製画分) とそれよりも低分子画分 (低分子化 HCII 含有画分) とに分かれた。有効 HCII 精製画分は A₂₈₀ の最大ピークと一致した (第 1 図)。有効 HCII 精製画分の比活性は 17.1 U/A₂₈₀ であり、SDS-PAGE 分析の結果 72 kDa の位置に単一のバンドを与えた。さらに HPLC (G3000SW_{XL}) によっても単一のピークが検出されたことから、該精製画分は低分子化およびポリマー化した HC 分子を実質的に含まないことが示された。また、該精製画分の着色度

[$C.I. = A_{410}/A_{280} \times 1000$ と定義する]は4.2で、且つ実質的にハプトグロビン、トランスフェリンなどの着色物質を含まなかった。また、得られたHCII精製画分中のHCIIの総タンパク量に対する割合は99.9%以上であった。しかしながら、有効HCII精製画分を冷室にまたは室温で放置しておく、比較例1の場合と同様のHCIIの低分子化が進行した。

実施例1 疎水性クロマトグラフィーによる低分子化因子の除去 (I)

比較例2の工程(2)で得られたHCII含有画分の一部を、1.5M以上のNaClを含む40mMリン酸緩衝液(pH7.1)で平衡化したButyl Toyopearl (東ソー社製)に4℃で通した後、25℃で48時間以上インキュベートした。該溶液をHPLC(G3000SW_{XL})によって測定したところ、低分子化HCII含有率の増加は認められなかった。したがって、上記の疎水性クロマトグラフィー処理によって低分子化因子が除去されたことが明らかになった。

実施例2 疎水性クロマトグラフィーによる低分子化因子の除去 (II)

疎水性クロマト担体としてフェニルセファロース(ファルマシア社製)を用い、0.1M以上のNaClを含むリン酸緩衝液(pH8)を平衡化のために用いる以外は実施例1と同様の方法で疎水性クロマトグラフィー処理を行い、得られた未吸着画分を実施例1と全く同様の方法で処理してHCIIの低分子化の有無を調べたが、同様に低分子化は観察されなかった。さらにゲル濾過クロマトグラフィーを行った。その結果、SDS-PAGEで72kDaの位置に単一のバンドを示し(第2図)、HPLCでも単一のピークが検出された(第3図)。したがって、該精製画分は低分子化因子のみならず、低分子化およびポリマー化したHCIIも実質的に含まないことが示された。

実施例3 リジン基をリガンドとするアフィニティークロマトグラフィーによる
低分子化因子の除去

5 比較例2の工程(2)で得られたHCII含有画分の一部を、40mM リン酸緩衝液(pH7.6)で平衡化したリジン基をリガンドとする架橋アガロース支持体に4℃で通し、得られる未吸着画分を実施例1と全く同様の方法で処理してHCIIの低分子化の有無を調べたが、同様に低分子化は観察されなかった。したがって、上記のアフィニティークロマトグラフィー処理によって低分子化因子が除去されたことが明らかになった。

10 実施例4 水溶性ポリマーによる分画を用いた低分子化因子の除去

比較例2の工程(2)で得られたHCII含有画分の一部に、6~12%(w/v)となるようにPEG4000またはポリオキシエチレン(160)ポリオキシプロピレン(30)グリコール(商品名:プルロニックF68)を加えて一定時間放置した後、遠心分離により上清を回収した。該上清を比較例2の(3)の工程に付した後、実施例1と同様に処理してHCIIの低分子化の有無を調べたが、
15 同様に低分子化は観察されなかった。したがって、上記の水溶性ポリマーもしくは非イオン性界面活性剤を用いた分画によって低分子化因子が除去されたことが明らかになった。

20 実施例5 塩析による低分子化因子の除去

比較例2の工程(2)で得られたHCII含有画分の一部に、1M 塩化バリウム溶液を5~20%(v/v)となるように添加して一定時間放置した後、遠心分離により上清を回収した。該上清を比較例2の(3)の工程に付した後、実施例1と同様に処理してHCIIの低分子化の有無を調べたが、同様に低分子化は観察されなかった。したがって、上記の塩析処理によって低分子化因子が除去され
25 たことが明らかになった。

実施例 6 多孔性中空糸を用いた濾過処理によるウイルス除去

多孔性中空糸としてBMM (Bemberg Microporous Membrane、旭化成株式会社製) を用いたモジュールを使用した。BMMは銅アンモニア法による再生セルロースを原料とした多孔性中空糸である。BMMモジュールとして、膜となる周壁が150層以上の多重層構造であるプラノバ15 (旭化成株式会社製) を使用した。モジュール内の多孔性中空糸の仕様は以下の通りである。

平均孔径: $15\text{ nm} \pm 2\text{ nm}$

中空糸内径: $330 \pm 30\text{ }\mu\text{m}$

膜厚: $27 \pm 3\text{ }\mu\text{m}$

このモジュールは上記多孔性中空糸と、高圧蒸気滅菌可能なポリカーボネート製のプラスチック容器、およびこれらを一体化するポリウレタン系接着剤により構成されている。このモジュールは、オートクレイブ滅菌されており、モジュール内には注射用蒸留水が充填されている。プラノバを構成する各種材料の安全性は、日本薬局方の定める方法により確認されている (BMM商品説明書より)。

実施例 1 で得られた低分子化因子、低分子化HCII、ポリマー化HCII および着色物質を実質的に含まないHCII 精製画分にHCV陽性血漿を添加し、 $0.2\text{ }\mu\text{m}$ 膜 (ミリポア社製) で濾過した後、クロスフロー濾過法により上記BMMモジュールで濾過した。濾過条件は、HCII 溶液の温度 $4 \sim 10^{\circ}\text{C}$ 、濾過圧力 0.8 kgf/cm^2 とした。濾過工程でのHCII の濾液への回収率は97%であった。濾過処理終了後、HCII 溶液の力価調整および除菌濾過を行った。得られたHCII 溶液を分注し液状製剤を製造した。

実験例 1 ウイルス除去効果の確認

実施例 6 で得られた製剤中のC型肝炎ウイルスゲノム量を、PCR法により測定した。

(1) 試料からのRNAの抽出

該製剤にグアニジン、グアニジン・チオシアネートおよびサルコシルを加え、さらにフェノール・クロロホルムを加えて除タンパクした。次いでイソアミルアルコールを用いてRNAを沈降させた。各反応は室温にて行った。

(2) 逆転写酵素によるcDNAの作製

(1) で得られたRNAにランダムヘクサマーを結合させ、逆転写酵素を用いて42℃で1時間反応させ、cDNAを得た。

(3) Nested PCR法によるcDNAの増幅

HCVプライマー [HCVゲノムの5' 末端側の非コード領域より、センスプライマーとして 5'-GTGAGTACACCGGAATTGCC-3' (配列番号1) と 5'-CACGGTCTACGAGACCTCCC-3' (配列番号2)、アンチセンスプライマーとして 5'-ACGACCGGGTCCTTTCTTGG-3' (配列番号3) と 5'-GCACTCGCAAGCACCTATC-3' (配列番号4) を用いた] と Taq ポリメラーゼを用い、HCV cDNAの増幅を行った。熱変性は94℃で30秒間行い、アニーリングは55℃で2分間行った。cDNAの増幅は72℃で2分間行った。この操作を20サイクル以上行い、反応産物を得た。

(4) PCR反応産物の分析

(3) で得られた反応産物について、エチジウム・ブロマイドを用いた6% (w/v) ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (PAGE) を行った。

実験の結果、濾過処理前はHCII溶液中のHCVゲノム量は103 PCR単位/mlであったが、濾過処理後は検出限界 (1 PCR単位/ml) 以下にまで低下した。

産業上の利用可能性

本発明のHCII含有製剤の製造方法によれば、低分子化因子がHCIIから除去されるので、HCIIの保存中の分解 (低分子化) が起こらない。したがって、よ

り高純度で安全且つ有効なH C II 含有製剤を提供することができる。

配列リストのフリーテキスト

配列番号 1

- 5 H C V ゲノムの 5' 末端側の非コード領域を増幅させるためのセンスプライマーとして働くように設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号 2

- 10 H C V ゲノムの 5' 末端側の非コード領域を増幅させるためのセンスプライマーとして働くように設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号 3

- 10 H C V ゲノムの 5' 末端側の非コード領域を増幅させるためのアンチセンスプライマーとして働くように設計されたオリゴヌクレオチド。

配列番号 4

- 15 H C V ゲノムの 5' 末端側の非コード領域を増幅させるためのアンチセンスプライマーとして働くように設計されたオリゴヌクレオチド。

本出願は日本国で出願された平成 9 年特許願第 3 2 0 3 4 9 号を基礎としており、そこに開示される内容は本明細書にすべて包含されるものである。

- 20 また、ここで述べられた特許および特許出願明細書を含む全ての刊行物は、引用によりそれらの内容の全てが本明細書に組み込まれるものである。

請 求 の 範 囲

1. 低分子化因子、低分子化ヘパリンコファクターII、ポリマー化ヘパリンコファクターII および着色物質からなる群より選択される少なくとも1つの夾雑物質を実質的に含有しないヘパリンコファクターII 含有製剤。
5
2. 低分子化因子および低分子化ヘパリンコファクターII を実質的に含有しないヘパリンコファクターII 含有製剤。
3. さらにポリマー化ヘパリンコファクターII および/または着色物質を実質的に含有しない請求の範囲2のヘパリンコファクターII 含有製剤。
- 10 4. 製剤中に含有されるヘパリンコファクターII の純度が98%以上であるヘパリンコファクターII 含有製剤。
5. 感染力のあるウイルスを実質的に含有しない請求の範囲1～4のいずれかのヘパリンコファクターII 含有製剤。
- 15 6. ヘパリンコファクターII および低分子化因子を含有する溶液からヘパリンコファクターII と低分子化因子を分離する工程を含む、ヘパリンコファクターII 含有製剤の製造方法。
7. 該工程が疎水性クロマトグラフィー、水溶性ポリマーによる分画、塩析および塩基性アミノ酸をリガンドとするアフィニティークロマトグラフィーからなる群より選択される1または2以上の処理である請求の範囲6の方法。
- 20 8. さらに低分子化ヘパリンコファクターII および/または着色物質を除去する工程を含む請求の範囲6または7の方法。
9. 該工程がゲル濾過クロマトグラフィー処理である請求の範囲8の方法。
10. さらに濾過処理、加熱処理および界面活性剤処理からなる群より選択される少なくとも1つのウイルス除去または不活化処理の工程を含む請求の範囲6～
25 9のいずれかの方法。
11. 該工程が多孔性中空糸による濾過処理である請求の範囲10の方法。

2/2

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as antisense primer for
amplifying 5' non-coding region of HCV genome.

<400>

3

acgaccgggt cctttcttgg

20

<210>

4

<211>

20

<212>

DNA

<213>

Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as antisense primer for
amplifying 5' non-coding region of HCV genome.

<400>

4

gcactcgcaa gcaccctatc

20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/04939

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁶ A61K38/00-38/58, C07K14/47, C07K14/745, C07K14/81,
C07K1/14-1/36

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁶ A61K38/00-38/58, C07K14/47, C07K14/745, C07K14/81,
C07K1/14-1/36

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CAPLUS (STN), REGISTRY (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|--|-----------------------|
| X Y | JP, 9-286797, A (The Green Cross Corp.), 4 November, 1997 (04. 11. 97), Refer to Par. Nos. [0016] to [0021], [0031] to [0034] (Family: none) | 1-10 11 |
| X Y | TOULON, P. et al., "Purification of heparin cofactor II from human plasma" J. Chromatogr., 1991, Vol. 539, No. 2, p.493-500, refer to ABSTRACT, Purification of HCII, TABLE I | 1-4, 6-9 5, 10, 11 |
| X Y | PETZELBAUER, E. et al., "MODULATION OF HEPARIN COFACTOR II ACTIVITY BY GLYCOSAMINOGLYCANS AND ADHESIVE GLYCOPROTEINS" Thromb. Res., 1992, Vol. 66, p.559-567, refer to ABSTRACT, MATERIALS AND METHODS, Fig. 1 | 1-4, 6, 7 8-11 |

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not
considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is
cited to establish the publication date of another citation or other
special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other
means
"P" document published prior to the international filing date but later than
the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority
date and not in conflict with the application but cited to understand
the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be
considered novel or cannot be considered to involve an inventive step
when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be
considered to involve an inventive step when the document is
combined with one or more other such documents, such combination
being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
17 February, 1999 (17. 02. 99)

Date of mailing of the international search report
2 March, 1999 (02. 03. 99)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/04939

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|--|-----------------------|
| X Y | YAMAGISHI, R., et al., "PURIFICATION AND BIOLOGICAL PROPERTY OF HEPARIN COFACTOR II: ACTIVATION OF HEPARIN COFACTOR II AND ANTITHROMBIN III BY DEXTRAN SULFATE AND VARIOUS GLYCOSAMINOLYCANS" Thromb. Res., 1984, Vol. 36, p.633-642, MATERIALS AND METHODS (<u>Purification OF HCII</u>), refer to TABLE 1 | 1-4, 6, 7 8-11 |
| Y | JP, 2-167232, A (Asahi Chemical Industry Co., Ltd.), 27 June, 1990 (27. 06. 90), Refer to Claims (Family: none) | 11 |
| A | JP, 3-128398, A (The Green Cross Corp.), 31 May, 1991 (31. 05. 91), Refer to the full text & EP, 408029, A1 & US, 5138034, A | 1-4, 6, 7 |
| A | EP, 416983, A1 (CENTRE REGIONAL DE TRANSFUSION SANGUINE DE LILLE), 13 March, 1991 (13. 03. 91), Refer to the full text & JP, 4-124199, A & US, 5679776, A | 1-4, 6, 7 |
| A | US, 5219995, A (ALPHA THERAPEUTIC CORPORATION), 15 June, 1993 (15. 06. 93), Refer to the full text & WO, 94/01466, A1 & EP, 607392, A1 & JP, 6-511018, A | 1-4, 6, 7 |
| A | EP, 496725, A2 (IMMUNO AKTIENGESELLSCHAFT), 29 July, 1992 (29. 07. 92), Refer to the full text & US, 5281661, A & US, 5409990, A & JP, 4-295432, A | 1-4, 6, 7 |

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁸ A61K38/00-38/58, C07K14/47, C07K14/745,
C07K14/81, C07K1/14-1/36

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁸ A61K38/00-38/58, C07K14/47, C07K14/745,
C07K14/81, C07K1/14-1/36

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS (STN), REGISTRY (STN)

C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
|-----------------|--|-----------------------|
| X Y | JP, 9-286797, A (株式会社ミドリ十字), 4. 11月. 1997 (04. 11. 97), 段落0016~0021及び段落0031~0034参照, ファミリーなし | 1-10 11 |
| X Y | TOULON, P. et al., 'Purification of heparin cofactor II from human plasma' J. Chromatogr., 1991, Vol. 539, No. 2, p. 493-500, ABSTRACT; Purification of HCII, TABLE I 参照 | 1-4, 6-9 5, 10, 11 |

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

- の日の後に公表された文献
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

17. 02. 99

国際調査報告の発送日

02.03.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

森井 隆信

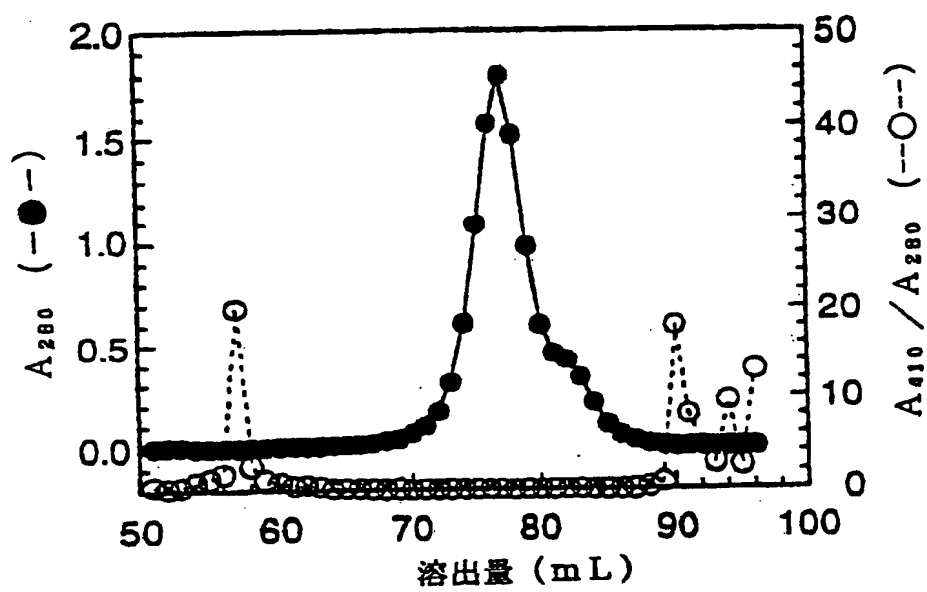


4C 9639

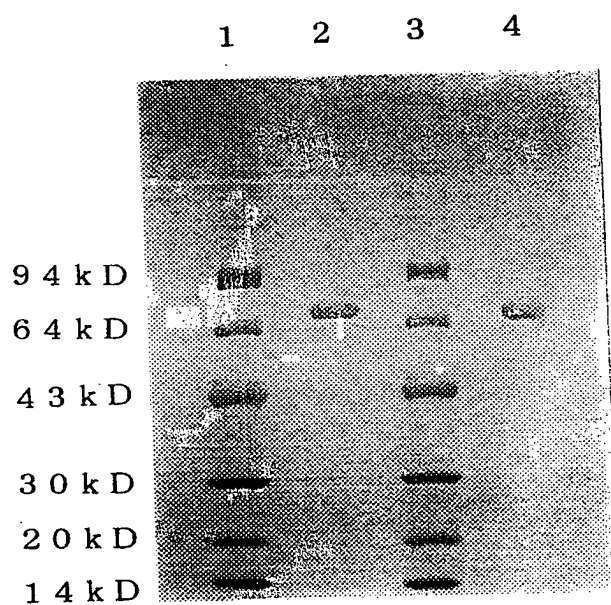
電話番号 03-3581-1101 内線 3452

| C (続き) . 関連すると認められる文献 | | 関連する 請求の範囲の番号 |
|-----------------------|--|-------------------|
| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | |
| X Y | PETZELBAUER, E. et al., 'MODULATION OF HEPARIN COFACTOR II ACTIVITY BY GLYCOSAMINOGLYCANS AND ADHESIVE GLYCOPROTEINS' Thromb. Res., 1992, Vol.66, p.559-567, ABSTRACT, MATERIALS AND METHODS, Fig. 1 参照 | 1-4, 6, 7 8-11 |
| X Y | YAMAGISHI, R., et al., 'PURIFICATION AND BIOLOGICAL PROPERTY OF HEPARIN COFACTOR II: ACTIVATION OF HEPARIN COFACTOR II AND ANTITHROMBIN III BY DEXTRAN SULFATE AND VARIOUS GLYCOSAMINOGLYCANS' Thromb. Res., 1984, Vol.36, p.633-642, MATERIALS AND METHODS (Purification of HCII), TABLE 1 参照 | 1-4, 6, 7 8-11 |
| Y | J P, 2-167232, A (旭化成工業株式会社), 27. 6月. 1990 (27. 06. 90), 特許請求の範囲参照, ファミリーなし | 11 |
| A | J P, 3-128398, A (株式会社ミドリ十字), 31. 5月. 1991 (31. 05. 91), 全文参照, & EP, 408029, A1 & US, 5138034, A | 1-4, 6, 7 |
| A | EP, 416983, A1 (CENTRE REGIONAL DE TRANSFUSION SANGUINE DE LILLE), 13. 3月. 1991 (13. 03. 91), 全文参照, & J P, 4-124199, A & US, 5679776, A | 1-4, 6, 7 |
| A | US, 5219995, A (ALPHA THERAPEUTIC CORPORATION), 15. 6月. 1993 (15. 06. 93), 全文参照, & WO, 94/01466, A1 & EP, 607392, A1 & J P, 6-511018, A | 1-4, 6, 7 |
| A | EP, 496725, A2 (IMMUNO AKTIENGESELLSCHAFT), 29. 7月. 1992 (29. 07. 92), 全文参照, & US, 5281661, A & US, 5409990, A & J P, 4-295432, A | 1-4, 6, 7 |

第 1 図

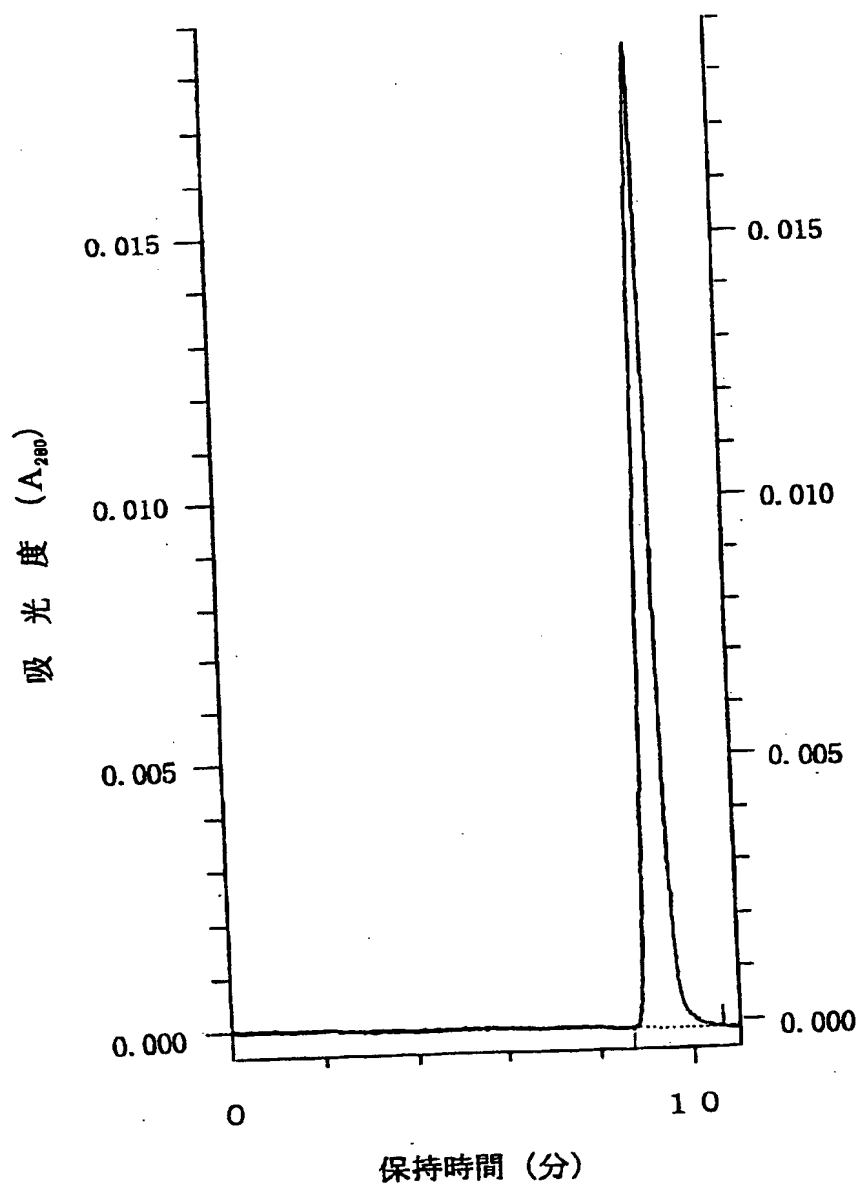


第 2 図



3/3

第 3 図



1/2

配列表

SPECIMEN SEQUENCE LISTING

- <110> Yoshitomi Pharmaceutical Industries, Ltd.
- <120> Heparin Co-factor II Preparation and Process for the Production Thereof
- <130> 09276
- <150> JP 9-320349
- <151> 1997-11-05
- <160> 4
- <210> 1
- <211> 20
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220>
- <223> Oligonucleotide designed to act as sense primer for amplifying 5' non-coding region of HCV genome.
- <400> 1
gtgagtacac cggaattgcc 20
- <210> 2
- <211> 20
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220>
- <223> Oligonucleotide designed to act as sense primer for amplifying 5' non-coding region of HCV genome.
- <400> 2
cacggtctac gagacctccc 20
- <210> 3
- <211> 20
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence